

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-241223

出 願 人

Applicant(s):

日本電気株式会社



2001年 6月 5日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3052740

【書類名】 特許願

【整理番号】 33703883

【提出日】 平成12年 8月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内

【氏名】 松本 達

【特許出願人】

【識別番号】 000004237

【氏名又は名称】 日本電気株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710078

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 電気化学センサ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 作用極、対極および参照電極を有する電気化学センサにおいて、前記参照電極の電位を検査する参照電極検査手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段は、参照電極の電位を測定する基準となる検査電極と、前記検査電極と前記参照電極との間の電位差を測定する測定器と、を有してなることを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極に代えて使用される予備参照電極を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 いずれかに記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極の交換時期を報知する報知手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 5】 請求項 1 乃至 4 いずれかに記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極に代えて予備参照電極を使用するように電極の切替を行う参照電極切替手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 6】 請求項 1 乃至 5 いずれかに記載の電気化学センサにおいて、少なくとも前記作用極上に固定化酵素層が形成されたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の電気化学センサにおいて、前記固定化酵素層の上部に、少なくとも作用極および参照電極を覆うように形成された、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含む制限透過層を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 8】 作用極、対極および参照電極を有する電気化学センサにおい

て、前記参照電極の使用が中止されたときに前記参照電極に代えて使用される予備参照電極を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極の使用を中止したときに前記参照電極に代えて予備参照電極を使用するように電極の切替を行う参照電極切替手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 10】 請求項 8 または 9 に記載の電気化学センサにおいて、少なくとも前記作用極上に固定化酵素層が形成されたことを特徴とする電気化学センサ。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の電気化学センサにおいて、前記固定化酵素層の上部に、少なくとも作用極および参照電極を覆うように形成された、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含む制限透過層を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、作用極、対極および参照電極を備えた電気化学センサに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

電気化学的測定を行うセンサにおいては、作用極、対極および参照電極からなる電極群を用いた 3 極法による測定が広く行われている。このようなセンサの例として、特開平 5 - 2 5 6 8 1 2 号公報の図 1 には、絶縁基板上面に、白金で形成した作用極、参照電極及び対極を備えたバイオセンサが記載されている。また、特開平 6 - 3 3 2 3 号公報の図 1 および図 6 には、単一の参照電極に対し、作用極および対極からなる一对の電極群が 2 組設けられた、電気化学式ガスセンサが記載されている。

【0003】

このような 3 極法による電気化学的測定では、各電極が正常に動作することを測定開始前に確認することが重要となるため、通常、測定前に校正液を用いて装

置の較正を行い、異常の有無の確認を行う。ところが、較正をした場合でも測定値の誤差が大きくなる場合がある。参照電極を用いるセンサでは、参照電極を基準として作用極に所定の電位を印加するため、センサの測定精度は参照電極の特性に大きく依存することとなる。ところが、参照電極の特性は種々の要因により変動し、電位が変化したり、参照電極としての機能が大きく損なわれることがある。測定前にセンサの較正を行うことにより、センサ全体を対象として異常の有無を確認できるものの、参照電極の電位の微妙な変動を検出することは、通常、困難である。このため、上記のように較正を行っても正しい測定値が得られない場合が生じるのである。

【0004】

また、通常の電気化学センサは、プロセスの簡便化、センサの小型化の観点から、上記公報に見られるように、同一基板上に作用極、対極および参照電極が形成される。このため、作用極や対極が正常に動作していても参照電極が故障した場合、電極群の設けられた基板全体を交換しなければならなくなる。したがって、参照電極を作用極や対極に比し破損しやすい材料で構成した場合、参照電極の寿命によってランニングコストの低減や連続測定可能時間の延長に一定の制限が加わることとなり、この点で改善の余地を有していた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記事情に鑑みなされたものであって、参照電極を含む3極法による電気化学センサにおいて、参照電極に異常が発生したことを迅速に検出し、かかる異常を速やかに解消して測定値の信頼性を高めるとともに、長期にわたる連続測定を可能とし、さらにランニングコストの低減を図ることを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決する本発明は、以下の事項により特定される。

[1] 作用極、対極および参照電極を有する電気化学センサにおいて、前記参照電極の電位を検査する参照電極検査手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔2〕〔1〕に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段は、参照電極の電位を測定する基準となる検査電極と、前記検査電極と前記参照電極との間の電位差を測定する測定器と、を有してなることを特徴とする電気化学センサ。

〔3〕〔1〕または〔2〕に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極に代えて使用される予備参照電極を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔4〕〔1〕乃至〔3〕いずれかに記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極の交換時期を報知する報知手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔5〕〔1〕乃至〔4〕いずれかに記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極検査手段により前記参照電極の異常電位が検出されたときに前記参照電極に代えて予備参照電極を使用するように電極の切替を行う参照電極切替手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔6〕〔1〕乃至〔5〕いずれかに記載の電気化学センサにおいて、少なくとも前記作用極上に固定化酵素層が形成されたことを特徴とする電気化学センサ。

〔7〕〔6〕に記載の電気化学センサにおいて、前記固定化酵素層の上部に、少なくとも作用極および参照電極を覆うように形成された、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含む制限透過層を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔8〕作用極、対極および参照電極を有する電気化学センサにおいて、前記参照電極の使用が中止されたときに前記参照電極に代えて使用される予備参照電極を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔9〕〔8〕に記載の電気化学センサにおいて、前記参照電極の使用を中止したときに前記参照電極に代えて予備参照電極を使用するように電極の切替を行う参照電極切替手段を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

〔10〕〔8〕または〔9〕に記載の電気化学センサにおいて、少なくとも前記作用極上に固定化酵素層が形成されたことを特徴とする電気化学センサ。

〔11〕〔10〕に記載の電気化学センサにおいて、前記固定化酵素層の上部に

、少なくとも作用極および参照電極を覆うように形成された、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含む制限透過層を備えたことを特徴とする電気化学センサ。

【 0 0 0 7 】

上記参照電極検査手段を備えた電気化学センサによれば、参照電極が異常電位を示し正常に動作しない状態になったことを迅速に検出することができる。従来技術においてはセンサの異常の確認は較正により行われ、センサ全体として異常を検出する方式が採用されていた。しかし、これでは参照電極自体の動作不良を確認することは困難であった。特に、参照電極が、破損まで至らないものの自然電位が正常な値から逸脱した状態にあるとき、従来技術では異常を検出できずに参照電極が正常に動作しているものとして測定が行われるため、異常が発生していることに気がつかずに測定を行ってしまうことがあった。これに対し、参照電極検査手段を備えた電気化学センサでは、参照電極のわずかな電位変動も正確に検出できるので、参照電極を交換すべき時期となったことを的確に把握でき、測定値の信頼性を向上させることができる。

【 0 0 0 8 】

参照電極検査手段は種々のものを採用できるが、参照電極の電位を測定する基準となる検査電極と、この検査電極と参照電極との間の電位差を測定する測定器と、を有してなる構成とすることが好ましい。検査電極の材料、構造については特に制限がないが、たとえば参照電極と同じ構成とすることができる。測定器は、たとえば電圧計等を用いることができる。

【 0 0 0 9 】

上記予備参照電極を備えた電気化学センサによれば、ランニングコストの低減を図ることができ、さらに、長期にわたる連続測定が可能となる。従来技術においては、参照電極が破損した場合、電極群の形成された基板全体を交換しなければならず、連続測定の障害となるとともに、ランニングコストの上昇を招く要因となっていた。これに対し上記センサによれば、参照電極の破損を検出した場合には、基板全体を交換することなく予備参照電極に切り替えることで対応できるので、高精度の測定を連続的に行うことができ、ランニングコストの低減を図る

ことができる。

【 0 0 1 0 】

予備参照電極は、参照電極が正常に動作しなくなった場合に参照電極に代えて使用するものである。したがって、参照電極が故障する前に予備参照電極が故障しないよう、予備参照電極の寿命を長くすることが望ましい。ところが、参照電極と予備参照電極は、プロセス上の理由等により同じ材料で構成する場合が多いため、材料の差異により長寿命化を図ることは困難な場合がある。このため、予備参照電極は、作用極、対極および参照電極と接続した電源とは接続せず、電圧も印加しない状態とすることが好ましい。また、予備参照電極の寿命を長くするために、フォトレジスト等により被覆してもよい。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

本発明において、作用極および対極の数は特に制限がない。複数の成分を単一のセンサで測定する場合には、作用極や対極を複数設けることが有効となり得る。一方、参照電極については、測定に用いる参照電極と、予備参照電極とにより構成することが好ましい。

【 0 0 1 2 】

本発明における検査電極は、通常、一つ設ければよいが、複数とすることもできる。検査電極は、参照電極の電位を検査するものであるが、常時検査する方式でも、測定前に検査する方式でもよい。なお、検査電極は、予備参照電極と兼用した構成とすることもできる。

【 0 0 1 3 】

予備参照電極は参照電極に代えて使用するものである。予備参照電極から参照電極への切替は、測定時間、測定回数、参照電極電位低下等の異常の発生等を基準に行うことができる。参照電極を使用しているときは予備参照電極は使用しない。参照電極から検査電極への切替は、センサに組み込まれたプログラムによって自動的に回路を変更することで実現することができる。また、参照電極の交換時期を報知する報知手段によって交換時期を認識した使用者が、センサに設けられた所定の切替スイッチを切り替えることによって参照電極から検査電極への電

極の切替を行う方式とすることもできる。

【0014】

なお、参照電極検査手段により参照電極の異常電位が検出されたときに切替を行う方式を採用した場合、電位の異常に関する判断は、測定の目的、用途等に応じて適宜設定される。たとえば、使用中の参照電極の電位が10mV以上変動した場合を異常と判断する、等の方式とすることができる。

【0015】

本発明において、検査電極と予備参照電極を同時に備えた構成とすることが好ましい。このようにすれば、参照電極に異常が生じたことを迅速、的確に検出し、予備の参照電極に切り替えることで高精度の測定を連続的に行うことができる。この際、電極群の形成された基板全体を交換する必要がないので、ランニングコストを大幅に低減することができる。

【0016】

本発明において、作用極、対極、参照電極および予備参照電極は、同一基板上に形成されることが好ましい。このようにすれば製造プロセスが簡便になるとともに、センサの小型化が容易となる。

【0017】

本発明に係るセンサの好ましい構成として、少なくとも作用極上に固定化酵素層が形成されたセンサを挙げることができる。この構成のセンサは酵素反応と電気化学反応を組み合わせた測定方法によるものであり、測定方式は、たとえば、溶液中の化学物質を酵素の触媒機能により他の物質に変換し、変換された物質の発生量を測定する方式を採用することができる。たとえばグルコースバイオセンサでは、グルコースをグルコースオキシターゼ（GOX）によって酸化し、グルコノラクトンと過酸化水素とし、発生した過酸化水素の測定によりグルコース濃度を定量することができる。また、酵素層近傍における酸素の減少にともなう酸素還元電流の減少値を計測し、これによりグルコース濃度を定量する方式を採用することもできる。

【0018】

上記のように固定化酵素層を設けたセンサとした場合、固定化酵素層の上部に

、作用極、対極、参照電極、および検査電極を覆うように形成された、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含んでなる制限透過層を設けた構成とすることが好ましい。このようにすれば、測定対象となる化学物質の過剰な拡散が制限され、測定可能範囲を高濃度にまで拡大するとともに、低濃度領域の測定に関しても精度の向上を図ることができる。また、汚染物質や干渉物質の透過を制限し、測定の安定性を向上させることができる。汚染物質とは電極部に付着して測定値の精度を低下させる物質であり、生体の体液を測定試料とする場合のタンパク質や尿素化合物等が例示される。一方、干渉物質とは、電極反応に干渉して測定値の精度を低下させる物質である。たとえば、グルコース由来の過酸化水素を測定する方式のセンサでは、アスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンといった物質が干渉物質となる。

【 0 0 1 9 】

固定化酵素層を設けたセンサでは、いわゆる干渉物質の影響を低減でき参照電極の寿命を長くできる関係で、本発明の効果がより顕著に発揮される。参照電極の寿命が短い場合は、予め定めた期間が経過したときに速やかに電極部分を交換するという使用方法が一般的となる。これに対して、参照電極が長寿命化したセンサにあっては、交換時期を予め定めることはせずに、参照電極を含む各電極に異常が発生するまで使用を継続するという使用方法が可能となるが、その一方、このような使用法を可能とするためには電極交換時期を的確に把握することが必要となる。特に参照電極については、前記したように、破損に至らないまでも電位が変動して測定値に影響を与える場合があり、このような状態を正確に検出し、交換時期を的確に把握することが重要となる。この点、本発明によれば、参照電極の電位の微妙な変化を検出できるため、交換時期を的確に把握でき、上記制限透過層を設けることによる長寿命化の利点を十分に生かすことができる。

【 0 0 2 0 】

本発明において、参照電極検査手段により参照電極の異常電位が検出されたときに参照電極の交換時期を報知する報知手段を備えた構成とすることが好ましい。このようにすれば、参照電極の交換時期を的確に把握できる。報知手段としては、センサと接続したディスプレイに参照電極の交換時期を表示する方式のほか

、音、光、振動、色彩、光、図形、熱により交換時期を伝達する方式を採用することもできる。

【 0 0 2 1 】

以下、本発明の好ましい実施の形態について図面を参照して説明する。

【 0 0 2 2 】

(第 1 の実施の形態)

本実施形態に係るセンサの構造を図 1 に、このセンサを含む測定装置全体の構造を図 3 に示す。

【 0 0 2 3 】

図 1 に示す本実施形態のセンサは、酵素反応により測定対象物質を他の物質に変換し、その濃度を電気化学的に測定する方式のバイオセンサである。絶縁基板 1 上に作用極 2、対極 3、および参照電極 4 が形成されている。そして、参照電極 4 の電位を測定し検査する検査電極 8 が形成されている。これらの電極の上には、結合層 2 0 (膜厚 1 0 ~ 5 0 n m 程度)、固定化酵素層 2 1 (膜厚 2 0 0 ~ 1 0 0 0 n m 程度) および制限透過層 2 2 (膜厚 2 0 ~ 2 0 0 n m 程度) がこの順で形成されている。

【 0 0 2 4 】

絶縁基板 1 の材料としては、たとえばセラミックス、ガラス、石英、プラスチック等の絶縁性の高い材料から主としてなるものを用いることができる。耐水性、耐熱性、耐薬品性および電極との密着性に優れた材料であることが好ましい。

【 0 0 2 5 】

作用極 2 および対極 3 の材料としては、たとえば白金、金、銀、炭素等から主としてなるものを用いることができ、このうち耐薬品性および過酸化水素の検出特性に優れた白金が好ましく用いられる。絶縁基板 1 上の作用極 2 および対極 3 は、スパッタリング法、イオンプレーティング法、真空蒸着法、ケミカル・ペーパー・ディポジッション法、電解法等により形成することができ、このうちスパッタリング法が好ましい。絶縁基板 1 との密着性が良好であり、かつ、白金層を容易に形成できる上、良好な表面平滑性が得られるからである。また、絶縁基板 1 と、作用極 2 および対極 3 との密着性を改善するために、これらの間にチタン

層やクロム層などを設けても良い。

【 0 0 2 6 】

本実施形態では、参照電極 4 および検査電極 8 は同一の構造からなっている。これらの電極は種々の材料により構成することができるが、簡便なプロセスで作製でき、安定な特性が得られる、銀／塩化銀電極（銀の上に塩化銀が積層した構造を含む電極）とすることが望ましい。

【 0 0 2 7 】

銀／塩化銀電極の構造としては、感度および強度が良好なことから、チタン、銀、および塩化銀がこの順に設けられた積層体、または、チタン、白金、銀、および塩化銀がこの順に設けられた積層体が好ましい。参照電極 4 および検査電極 8 は、スパッタリング法、イオンプレーティング法、真空蒸着法、ケミカル・ペーパー・ディポジッション法、電解法等、種々の方法を用いて形成することができる。

【 0 0 2 8 】

たとえば銀／塩化銀電極とする場合は、まず銀膜を形成した後、銀よりもイオン化傾向の大きい塩素化合物を含む水溶液、たとえば塩化鉄水溶液に浸漬して作製することができる。銀膜は、銀鏡反応法、スパッタリング法、イオンプレーティング法、真空蒸着法、ケミカル・ペーパー・ディポジッション法で形成することができ、このうち、大量生産が容易で、表面平滑性の良好なスパッタリング法が望ましい。銀膜の形成された基板を浸漬する溶液は、銀よりもイオン化傾向もしくは酸化還元電位の低い金属塩化物溶液である塩化鉄（III）、塩化銅（I）、（II）、塩化鉄（II）、塩化鉛、塩化錫、塩化ニッケル、塩化クロム、塩化亜鉛、塩化マンガン等を用いることができ、このうち、低コスト、低毒性である塩化鉄（II）溶液が望ましい。なお、塩化鉄（III）溶液を用いる場合の濃度は、1 mM 以上であればよいが、50 mM 程度または 50 mM を越えた程度が好ましい。

【 0 0 2 9 】

作用極 2 上に形成された結合層 2 0 は、その上の固定化酵素層 2 1 と、絶縁基板 1 および作用極 2 等の電極との密着性（結合力）を向上させる。また、絶縁基板 1 の表面のぬれ性を改善し、酵素を固定化した固定化酵素層 2 1 を形成する際

の膜厚の均一性を向上させる効果もある。さらには、作用極 2 での過酸化水素の反応に干渉するアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンに対する選択透過性もある。結合層 2 0 はシランカップリング剤から主としてなる。シランカップリング剤の種類としては、アミノシラン、ビニルシラン、エポキシシランが挙げられるが、このうち、密着性、選択透過性の観点から、アミノシランの一種である γ -アミノプロピルトリエトキシシランが好ましい。結合層 2 0 は、例えばシランカップリング剤溶液をスピンコートすることにより形成することができる。この際、シランカップリング剤濃度は、1 v/v% (体積/体積%) 程度とすることが好ましい。選択透過性が顕著に向上するからである。

【0030】

固定化酵素層 2 1 は、有機高分子を母材として、触媒機能をもつ酵素を固定化したものである。固定化酵素層 2 1 は、例えば、各種酵素、グルタルアルデヒド等のタンパク質架橋剤、およびアルブミンを含む溶液を、結合層 2 0 上に滴下し、スピンコート法にて形成される。アルブミンは、各種酵素を架橋剤の反応から保護するとともにタンパク質の基材となる。酵素としては、乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ラクトース酸化酵素、スクロース酸化酵素、エタノール酸化酵素、メタノール酸化酵素、スターチ酸化酵素、アミノ酸酸化酵素、モノアミン酸化酵素、コレステロール酸化酵素、コリン酸化酵素およびピルビン酸酸化酵素等、触媒反応の生成物として過酸化水素を生成する、または酸素を消費する酵素が挙げられる。

【0031】

ここで、2 種類以上の酵素を同時に用いることもできる。例えば、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ、およびサルコシンオキシダーゼがこれに該当する。これらの酵素を用いることによってクレアチニンの検出が可能になる。また、酵素と補酵素を同時に用いてもよい。例えば、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) がこれに該当する。これらの酵素を用いることによって3-ヒドロキシ酪酸の検出が可能になる。さらに、酵素と電子メディエータを同時に用いてもよい。この場合は、酵素によって還元された電子メディエータが電極表面上で酸化され、このときに得られる酸化電流値を測定する

。例えば、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムがこれに該当する。これらを用いることによってグルコースの検出が可能になる。

【 0 0 3 2 】

以上述べたように、固定化酵素層 2 1 は、少なくとも一種類の酵素を含み、測定対象物質を電極感応物質（過酸化水素等）に変換する機能を持つ構成であれば、特に限定されない。なお、固定化酵素層 2 1 の形成方法については、均一な膜厚を形成できる方法であれば特に制限がなく、スピンコート法以外にもスクリーン印刷法などを用いることもできる。

【 0 0 3 3 】

固定化酵素層 2 1 の上には、作用極 2、対極 3、参照電極 4 および検査電極 8 を覆うように制限透過層 2 2 が形成されている。制限透過層 2 2 は、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルを含んでなることが好ましい。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルとは、ポリカルボン酸の一部または全部をフルオロアルコールでエステル化した化合物をいう。フルオロアルコールとはアルコール中の水素のすべて、または少なくとも一つをフッ素に置き換えられたものである。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルとしては、たとえば、ポリメタクリル酸 1 H，1 H-パーフルオロオクチルやポリアクリル酸 1 H，1 H，2 H，2 H-パーフルオロデシルを用いることができる。制限透過層を構成するポリマーの分子量は、好ましくは 1 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0、さらに好ましくは 3 0 0 0 ~ 3 0 0 0 0 とする。分子量が大きすぎると溶液の調整が困難となり、制限透過層の薄層化が困難となる。分子量が小さすぎると十分な制限透過性が得られない。なお、ここでいう分子量とは数平均分子量をいい、GPC (Gel Permeation Chromatography) により測定される。

【 0 0 3 4 】

この制限透過層 2 2 は、パーフルオロヘキサン等のパーフルオロカーボンの溶媒で希釈したメタクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステル溶液を、触媒機能をもつ酵素を固定化した固定化酵素層 2 1 上に滴下してスピンコート法により形成することができる。溶液中のメタクリル酸樹脂フルオロアルコールエステル濃度は、測定対象物質にもよるが、0.1 ~ 5 重量%とすることが好ましく、0.

3重量%程度とすることがさらに好ましい。この範囲とすることにより良好な制限透過性が発現するからである。なお、制限透過層22の形成方法については、均一な厚さの層が得られる方法であれば制限がなく、スピンコート法以外にもスプレーコート法やディップ法なども用いることができる。

【0035】

本実施形態のセンサをグルコースセンサとして使用する場合、最外層の制限透過層22がグルコースの拡散速度を制限し、グルコース酸化酵素を使用した有機高分子膜4が拡散してきたグルコースと酸素で触媒反応して過酸化水素とグルコノラクトンを発生する。このうち過酸化水素が作用極2に到達した際の酸化電流を測定してグルコースの濃度を知ることができる。

【0036】

次に、上記した構成のセンサを含む測定装置全体の概略構成について、図3を参照して説明する。

【0037】

この測定装置は、センサ10、電気化学測定回路部11、データ処理部12およびデータ表示部13が、配線5により接続された構成となっている。センサ10は図1に基づいて説明した構造となっている。センサ10は消耗品であるため、交換が容易な脱着式とすることが好ましい。電気化学測定回路部11は、本実施形態ではポテンシオスタットを用いるが、センサ10に対して定電位を印加し、電流値を測定できる回路であれば、特に限定されない。

【0038】

データ処理部12は、電極の較正、測定、測定データの保存等を行う機能を有する。たとえば、センサを構成する各電極の交換時期を報知する手段や、センサに異常電流が流れていることを報知する手段等を含んだ構成とすることができる。本実施形態では、データ処理部12としてパーソナルコンピュータ（以下、パソコンと記述する）を用いているが、電気化学測定回路部11からの信号を処理できるマイクロプロセッサ等の演算部を持つものであれば特に限定されない。データ処理部12で処理された信号は測定値に換算され、データ表示部13で測定値として表示される。

【 0 0 3 9 】

上記した電極の交換時期を表示する手段は、たとえば参照電極に対して設置することができる。交換時期の判断は、測定時間、測定回数、電極電位低下等を基準に行うことができる。

【 0 0 4 0 】

データ表示部 1 3 は、本実施形態ではパソコン用のディスプレイを用いているが、データ処理部 1 2 によって処理されたデータを表示する機能を有するものであれば特に限定されない。本実施形態では、データを「表示」しているが、これ以外の報知手段として、音、光、振動、色彩、光、図形、熱によりデータの内容を伝達する方式を採用することもできる。配線 5 はこれらを接続できる電線であればよい。

【 0 0 4 1 】

本実施形態のセンサは、参照電極 4 と検査電極 8 の間には電圧計が設けられ、検査電極 8 により参照電極 4 の電位を検査できるようになっている。参照電極 4 は、前記したように、破損に至らないまでも電位が変動して測定値に影響を与える場合がある。この点、本実施形態のセンサは、検査電極 8 を有しているため、参照電極 4 の電位の微妙な変化を検出でき、交換時期を的確に把握でき、測定値の信頼性を高めることができる。

【 0 0 4 2 】

また、本実施形態のように特定構造の制限透過層 2 2 を備えた構成を採用した場合、汚染物質や干渉物質の透過が制限されるため、従来のセンサに比べ、参照電極の寿命が長くなり、この関係で、前記したように参照電極の電位の変動を正確に検出することが特に重要となる。この点、本実施形態のセンサでは、検査電極 8 により参照電極 4 の電位の変動を正確に検出できるので、制限透過層 2 2 を設けることによる長寿命化の利点を十分に生かすことができる。

【 0 0 4 3 】

(第 2 の実施の形態)

本実施形態に係るセンサの構造を図 2 に示す。基本構造は第 1 の実施の形態とほぼ同様であるが、予備参照電極 9 を設けた点が異なっている。予備参照電極 9

は、参照電極 4 の異常電位が検出されたときに参照電極 4 に代えて使用されるようになっている。

【0044】

このセンサを含む測定装置全体の構造を図 4 に示す。この測定装置は、センサ 10、電気化学測定回路部 11、データ処理部 12 およびデータ表示部 13 が、配線 5 により接続された構成となっている。データ処理部 12 に参照電極切り替え手段 14 が設けられており、この点が図 3 に示した装置と相違する。

【0045】

本実施形態に示す測定装置は、はじめは図 14 (a) の状態となっている。作用極 2、対極 3 および参照電極 4 はポテンシオスタット 7 に接続しており、作用極 2 および対極 3 の電位が所望の値に制御されるようになっている。検査電極 8 は接地され、参照電極 4 と検査電極 8 の間には電圧計 17 が設けられ、検査電極 8 により参照電極 4 の電位を検査できるようになっている。検査電極 8 は、不図示の参照電極切替手段と接続しており、この参照電極切替手段により、参照電極 4 に異常電位が検出されたとき、予備参照電極を使用するように電極の切替を行うようになっている。図 14 (b) は、参照電極 4 から予備参照電極 9 に切り替えた後の状態を示す図である。なお、参照電極切り替え手段 14 として、本実施形態では、測定装置に内蔵されたメモリに記憶された参照電極切替プログラムを用いている。

【0046】

本実施形態のセンサによれば、予備参照電極 9 および参照電極切り替え手段 14 が設けられているため、参照電極 4 に異常が発生したことを迅速に検出し、かかる異常を速やかに解消して測定値の信頼性を高めることができる。また、長期にわたる連続測定が可能となる上、電極の形成された基板の交換の頻度を低減できるためランニングコストを低減できる。

【0047】

【実施例】

実施例 1

本実施例では、図 1 に示す構成のセンサを作製し、性能を評価した。以下、こ

のセンサを作製した手順について説明する。

【 0 0 4 8 】

まず、10mm×6mmの石英基板上に、作用極、対極、参照電極および検査電極を形成した。作用極（面積7mm²）と対極（面積4mm²）は白金を用いて形成した。参照電極と検査電極は、銀／塩化銀の積層構造とし、まず、スパッタリング法により銀膜を形成した後、基板を塩化鉄水溶液に浸漬して参照電極および検査電極を形成した。

【 0 0 4 9 】

つづいて1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンコートして結合層を形成した後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。次いで、固定化酵素層の上に、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したメタクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピンコートした後、乾燥を行って制限透過層を形成した。スピンコートの条件は3000rpm、30秒間とした。メタクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルは住友スリーエム社製のフロラード722を使用した。フロラード722は、ポリメタクリル酸1H、1H-パーフルオロオクチルであり、平均分子量(Mn)は約7000程度(GPC測定値)である。希釈液であるパーフルオロヘキサンは、住友スリーエム社製のフロラード726を使用した制限透過層の厚みは約50nmとした。以上のようにしてセンサ部分を作製した。

【 0 0 5 0 】

つづいて、このセンサを電気化学測定回路部と、データ処理部と、データ表示部とに電線を用いて結線した。電気化学測定回路部は北斗電工社製のポテンシオスタットHOKUTODENKOPOTENTIOSTAT/GALVANOSTATHA150Gを使用した。データ処理部は日本電気(株)社製のパーソナルコンピュータPC-9821RaII23を使用した。データ表示部は、日本電気(株)社製のディスプレイPC-KP531を使用した。

【 0 0 5 1 】

次に、このセンサを150mMの塩化ナトリウムを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩

衝液中に浸漬して保存し、一日一回から数日に一回、200mg/dl グルコースを測定した。図5にこのセンサのグルコースに対するセンサ出力を示す電流値を測定した結果を示す。また、図6に基準電極として機能している参照電極の自然電位を測定した結果について示す。その結果、82日目に参照電極が破損することに伴って生じる自然電位の低下が起こり、正常な測定ができなくなることが確認された。

【0052】

本実施例に係るセンサによれば、検査電極を設けているため、センサの異常が参照電極の破損によるものであることを確認できた。

【0053】

実施例2

本実施例では、図2に示す構成のセンサを作製し、性能を評価した。以下、このセンサを作製した手順について説明する。

【0054】

まず、10mm×6mmの石英基板上に、作用極、対極、参照電極、検査電極および予備参照電極を形成した。作用極（面積7mm²）と対極（面積4mm²）は白金を用いて形成した。参照電極、検査電極および予備参照電極は、銀／塩化銀の積層構造とし、まず、スパッタリング法により銀膜を形成した後、基板を塩化鉄水溶液に浸漬して参照電極および検査電極を形成した。つづいて実施例1と同様にして1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピコートして結合層を形成した後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピコートして、固定化酵素層を形成し、さらに、フロラード722（ポリメタクリル酸1H，1H-パーフルオロオクチル）を用いて制限透過層を形成した。

【0055】

一方、比較として予備参照電極を具備しないセンサを作製した。

【0056】

つづいて、これらのセンサを電気化学測定回路部と、データ処理部と、データ表示部とに電線を用いて結線した。電気化学測定回路部は北斗電工社製のポテン

シオスタットHOKUTODENKOPOTENTIOSTAT/GALVANOSTATHA150Gを使用した。データ処理部は日本電気(株)社製のパーソナルコンピュータPC-9821RaII23を使用した。データ表示部は、日本電気(株)社製のディスプレイPC-KP531を使用した。このデータ処理部には、使用中の参照電極の電位が10mV以上変動した場合、すなわち、参照電極に異常が生じた場合に、予備の参照電極に切り替えるプログラムが書き込まれている。

【 0 0 5 7 】

次に、これらのセンサを150mMの塩化ナトリウムを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に浸漬して保存し、一日一回から数日に一回、200mg/dlグルコースを測定した。

【 0 0 5 8 】

検査電極、予備参照電極を具備する本実施例に係るセンサの評価結果を図7、8に示す。図7はグルコースに対するセンサ出力（電流値）、図8は参照電極の自然電位を示す。本実施例に係るセンサでは、82日目に参照電極が破損することによって生じる自然電位の低下が起こった。そこで、残りの予備参照電極を新たに参照電極として使用し始めると、正常な自然電位が得られ、再度正常な測定が可能になることがわかった。

【 0 0 5 9 】

一方、検査電極および予備参照電極を有しないセンサでは、正常に測定ができているか否かの確認ができず、上記のように参照電極の交換時期を把握することができなかった。

【 0 0 6 0 】

実施例 3

本実施例では、図9に示す構成のセンサを作製し、性能を評価した。このセンサは、予備参照電極9がフォトレジスト15で被覆された構造となっている。以下、このセンサを作製した手順について説明する。

【 0 0 6 1 】

まず、10mm×6mmの石英基板上に、作用極、対極、参照電極、検査電極および

予備参照電極を形成した。作用極（面積 7mm^2 ）と対極（面積 4mm^2 ）は白金を用いて形成した。参照電極、検査電極および予備参照電極は、銀／塩化銀の積層構造とし、まず、スパッタリング法により銀膜を形成した後、基板を塩化鉄水溶液に浸漬して参照電極、検査電極および予備参照電極を形成した。

【 0 0 6 2 】

つづいて予備参照電極の表面にフォトリソグラフィ法でフォトレジスト層を形成した。フォトレジストは、東京応化工業(株)製 OFPR800を使用した。

【 0 0 6 3 】

その後、実施例 1 と同様にして、 $1\text{v}/\text{v}\%$ の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピコートして結合層を形成した後、グルコース酸化酵素を含み、かつ $1\text{v}/\text{v}\%$ のグルタルアルデヒドを含む $22.5\text{w}/\text{v}\%$ アルブミン溶液をスピコートして固定化酵素層を形成し、さらに、フロラード 7 2 2（ポリメタクリル酸 1 H，1 H-パーフルオロオクチル）を用いて制限透過層を形成した。

【 0 0 6 4 】

一方、比較として検査電極および予備参照電極を具備しないセンサを作製した。

【 0 0 6 5 】

つづいて、これらのセンサを電気化学測定回路部と、データ処理部と、データ表示部とに電線を用いて結線した。電気化学測定回路部は北斗電工社製のポテンシオスタット HOKUTODENKOPOTENTIOSTAT/GALVANOSTATHA150G を使用した。データ処理部は日本電気(株)社製のパーソナルコンピュータ PC-9821RaII23 を使用した。データ表示部は、日本電気(株)社製のディスプレイ PC-KP531 を使用した。このデータ処理部には、使用中の参照電極の電位が 10mV 以上変動した場合、すなわち、参照電極に異常が生じた場合に予備の参照電極に切り替えるプログラムが書き込まれている。

【 0 0 6 6 】

次に、これらのセンサを 150mM の塩化ナトリウムを含む $\text{pH}7$ の TES（エヌ・トリス（ヒドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に浸漬して保存し、一日一回から数日に一回、 $200\text{mg}/\text{dl}$ グルコースを

測定した。

【0067】

検査電極、予備参照電極を具備する本実施例に係るセンサの評価結果を図10、11に示す。図10はグルコースに対するセンサ出力（電流値）、図11は参照電極の自然電位を示す。

【0068】

図示した結果から、本実施例に係るセンサは、95日間、安定してグルコースを測定できることが示された。また、参照電極は82日目に破損することに伴って生じる自然電位の低下が起こった（データを図示せず）。そこで、センサをアセトン溶液中に浸漬し、参照電極上に形成されているフォトレジストを取り除いた。そして、この参照電極を新たに基準電極として使用し始めると、正常な自然電位が得られ、再度正常な測定が可能になることがわかった。

【0069】

一方、検査電極および予備参照電極を具備しないセンサでは、正常に測定ができているか否かの確認ができなかった。また、85日以降センサ出力を示す電流値が急激に低下し、正常なグルコースの測定が不可能になった。図12に、このセンサのセンサ出力（電流値）経時変化を測定した結果を示す。

【0070】

参考例1

干渉物質が参照電極の電位に与える影響を測定した。測定に用いたセンサは、
(i)実施例1で用いたセンサ（ポリメタクリル酸1H，1H-パーフルオロオクチルにより構成された制限透過層を設けたもの）
(ii)制限透過層を有しないセンサ（制限透過層を有しないこと以外は(i)のセンサと同様の構造を有するもの）
とした。

【0071】

測定試料は、干渉物質1mM、塩化ナトリウム150mMを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ヒドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液とした。干渉物質は、（a）硫化カリウム、（b）臭化カリウム

、および(c)ヨウ化カリウムとした。

【0072】

測定試料は、最初は干渉物質を含まない溶液とし、測定開始後、約13～20秒の時点で干渉物質を添加した。

【0073】

図13の結果からわかるように、制限透過層を有しないセンサ(ii)では、干渉物質の添加によって電極電位が大きく低下していることがわかる。一方、制限透過層を有するセンサ(i)では、電極電位の変動が抑制されていることがわかる。

【0074】

参考例2

本実施例では、干渉物質として硫化カリウム1mM(終濃度)を含む100mg/dlグルコース溶液を測定試料とし、センサ出力および参照電極電位の経時変化を測定した。測定に用いたセンサは、実施例1で用いたセンサ(ポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルにより構成された制限透過層を設けたもの)と同様とした。

【0075】

測定結果を図15に示す。測定試料は、最初は硫化カリウムを含まないグルコース溶液であり、図中、矢印で示した時点で硫化カリウム1mMを添加した。このような高濃度の干渉物質を添加することによりセンサ出力および参照電極電位が変動した。干渉物質添加後もセンサは出力値を示しているが、その値は経時的に低下している。

【0076】

図5等で示したように参照電極が破損した場合は、センサ出力が大きく低下するため、参照電極自体の異常は検知できなくとも、センサに異常が生じたことについては認識できる場合がある。しかしながら本参考例のようにセンサがある程度の出力値を示している状態では、センサの異常を認識することが難しい。すなわち、参照電極が、破損まで至らないものの自然電位が正常な値から逸脱した状態にあるとき、従来のセンサでは異常を検出できずに参照電極が正常に動作しているものとして測定が行われ、測定値の精度低下をもたらす原因となる。

【 0 0 7 7 】

これに対し、検査電極を備える本発明の電気化学センサでは、参照電極のわずかな電位変動も正確に検出できるので、参照電極を交換すべき時期となったことを的確に把握でき、測定値の信頼性を向上させることができる。

【 0 0 7 8 】

【発明の効果】

以上説明したように本発明は、検査電極を備えているため、参照電極に異常が発生したことを迅速に検出し、かかる異常を速やかに解消して測定値の信頼性を高めることができる。また、予備参照電極を備えた構成とすれば、長期にわたる連続測定が可能となる上、ランニングコストの低減を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係るセンサの構成を示す図である。

【図 2】

本発明に係るセンサの構成を示す図である。

【図 3】

本発明に係るセンサを含む測定装置の概略構成図である。

【図 4】

本発明に係るセンサを含む測定装置の概略構成図である。

【図 5】

実施例で評価したセンサ出力の経時変化を示す図である。

【図 6】

実施例で評価した参照電極電位の経時変化を示す図である。

【図 7】

実施例で評価したセンサ出力の経時変化を示す図である。

【図 8】

実施例で評価した参照電極電位の経時変化を示す図である。

【図 9】

本発明に係るセンサの構成を示す図である。

【図 1 0】

実施例で評価したセンサ出力の経時変化を示す図である。

【図 1 1】

実施例で評価した参照電極電位の経時変化を示す図である。

【図 1 2】

実施例で評価したセンサ出力の経時変化を示す図である。

【図 1 3】

参照電極の電位に与える干渉物質の影響を示す図である。

【図 1 4】

本発明に係るセンサの構成を示す図である。

【図 1 5】

センサ出力および参照電極電位に与える干渉物質の影響を示す図である。

【符号の説明】

- 1 絶縁基板
- 2 作用極
- 3 対極
- 4 参照電極
- 5 電線
- 6 カバー
- 7 ポテンシオスタット
- 8 検査電極
- 9 予備参照電極
- 10 センサ
- 11 電気化学測定回路部
- 12 データ処理部
- 13 データ表示部
- 14 参照電極切り替え手段
- 15 フォトレジスト
- 17 電圧計

2 0 結合層

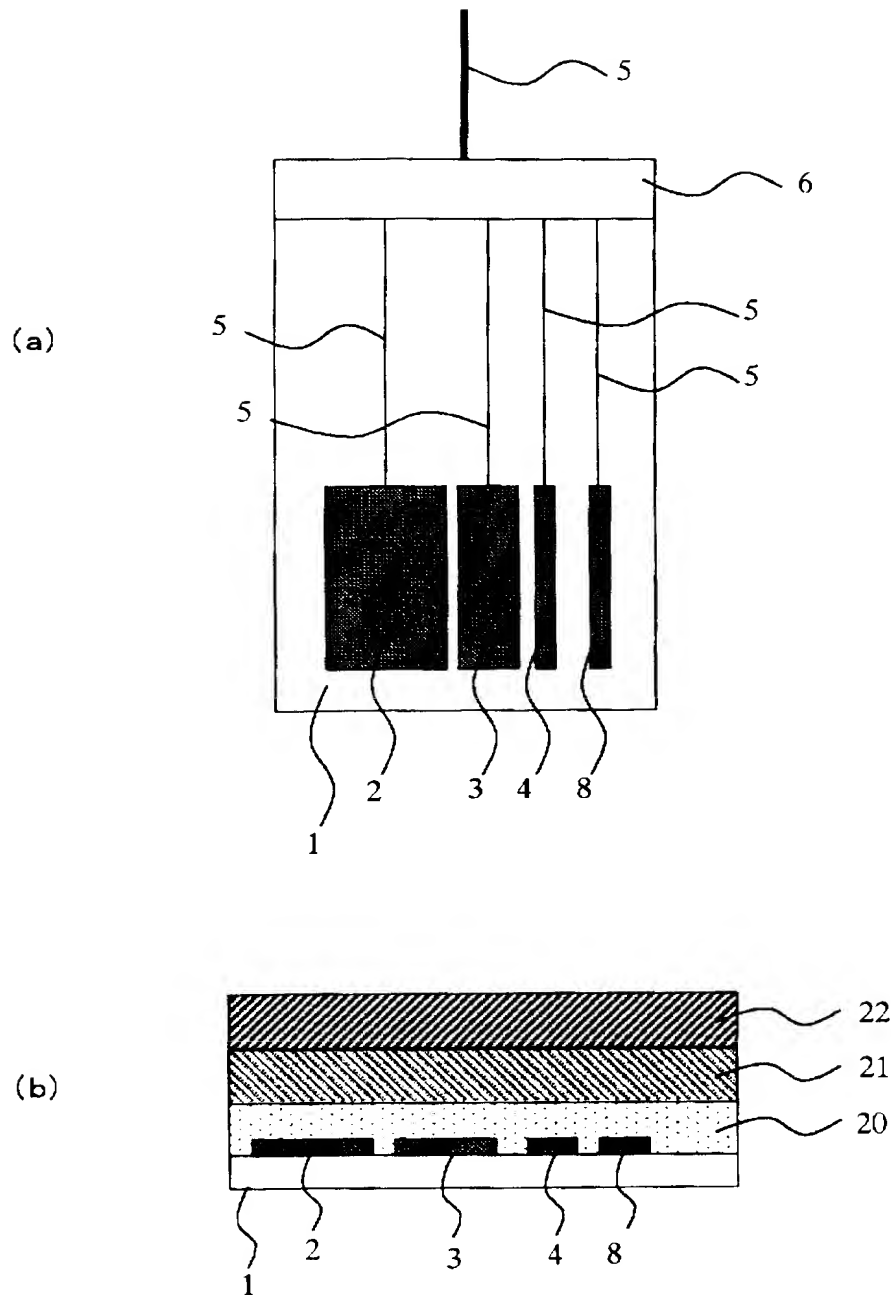
2 1 固定化酵素層

2 2 制限透過層

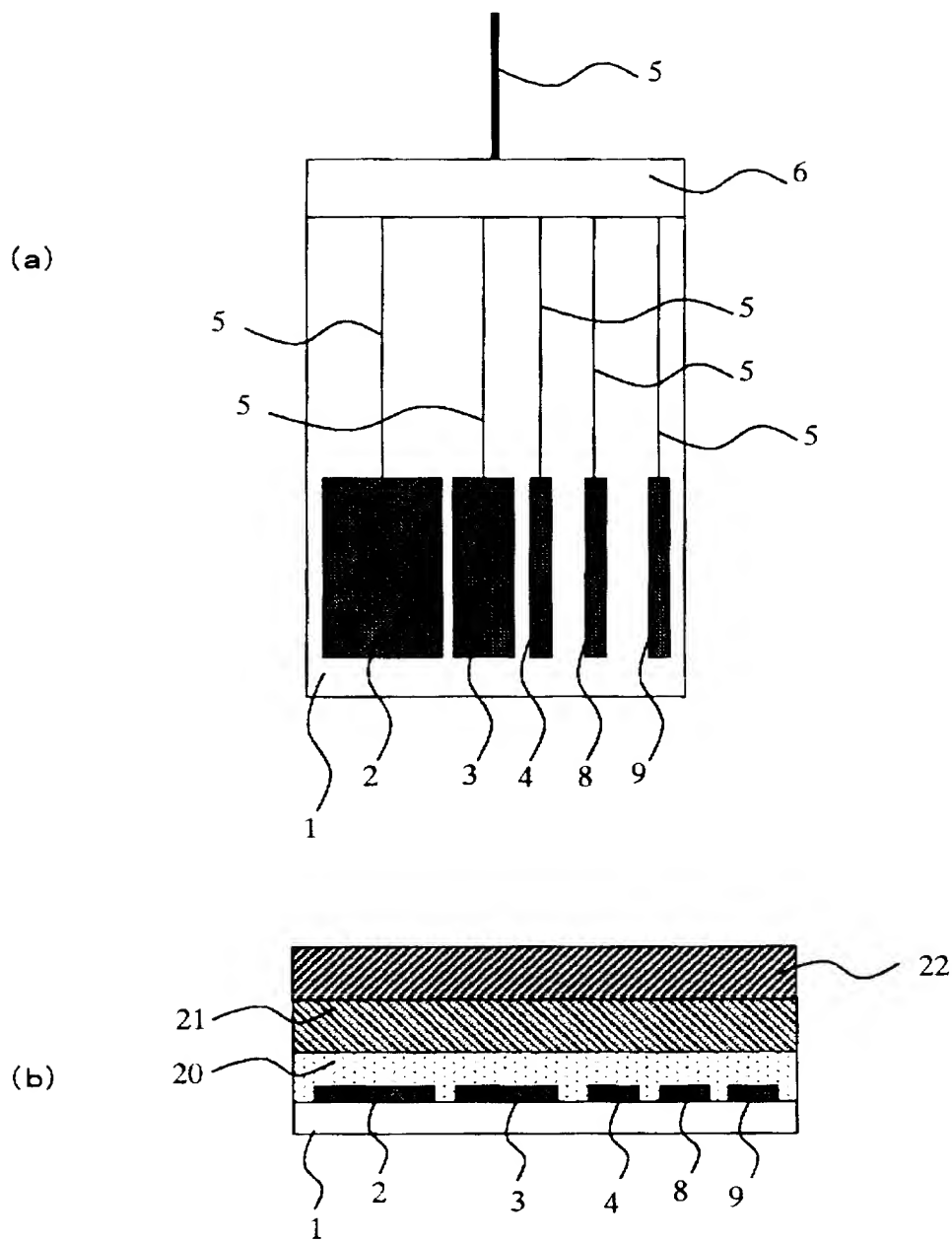
【書類名】

図面

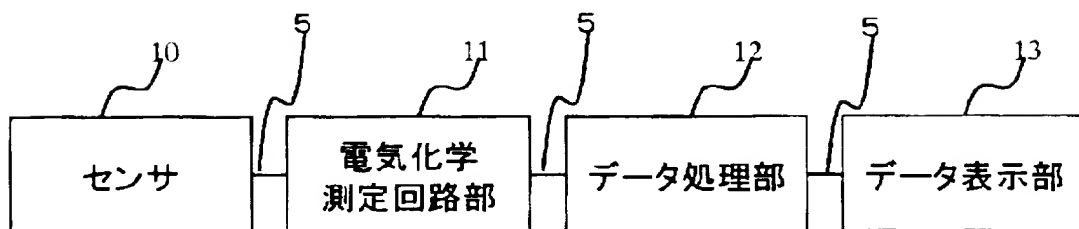
【図 1】



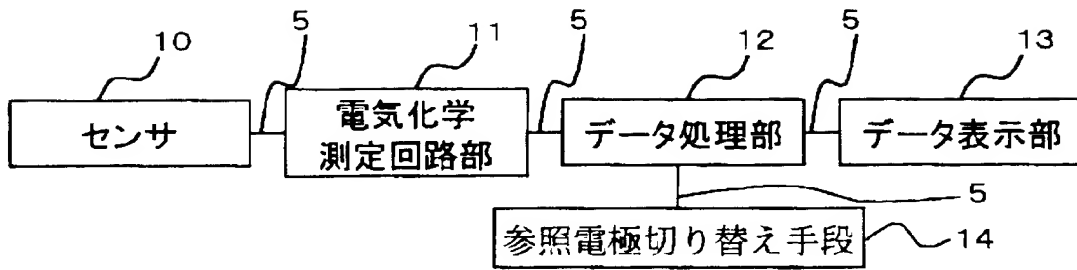
【図 2】



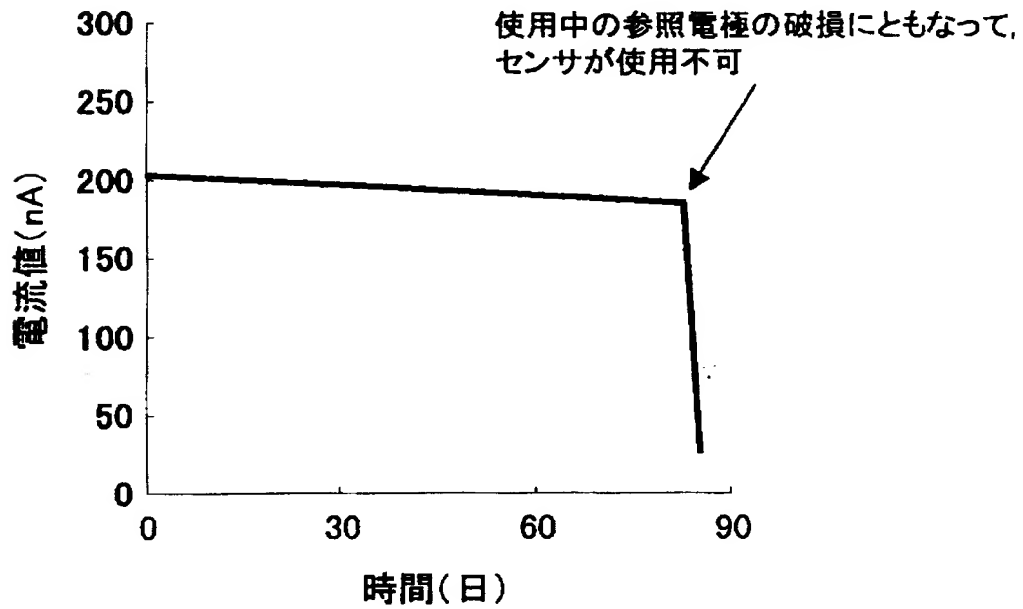
【図 3】



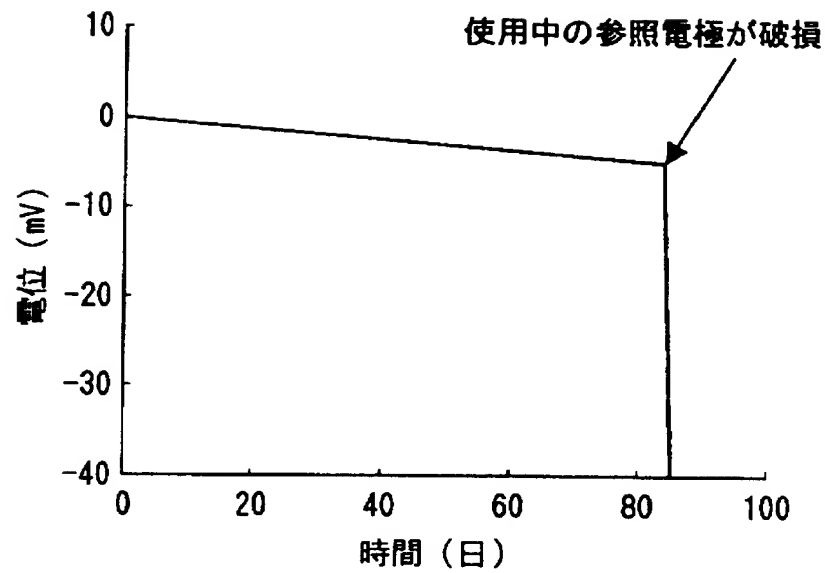
【図 4】



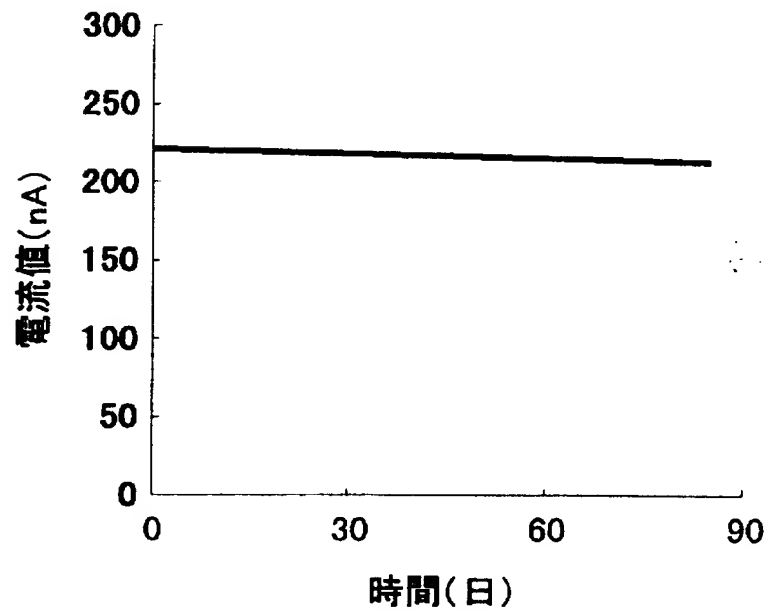
【図 5】



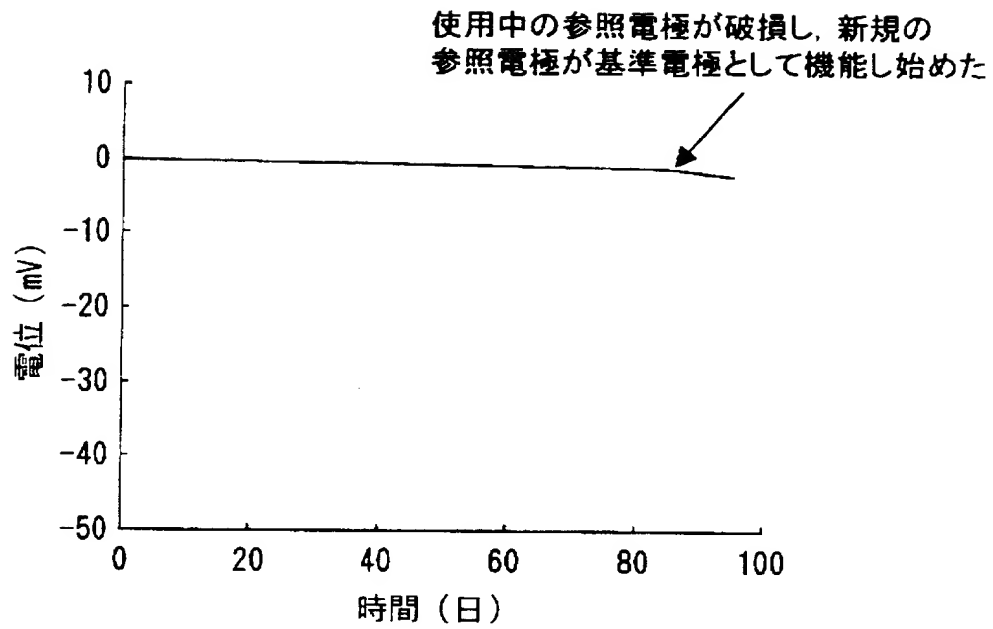
【図 6】



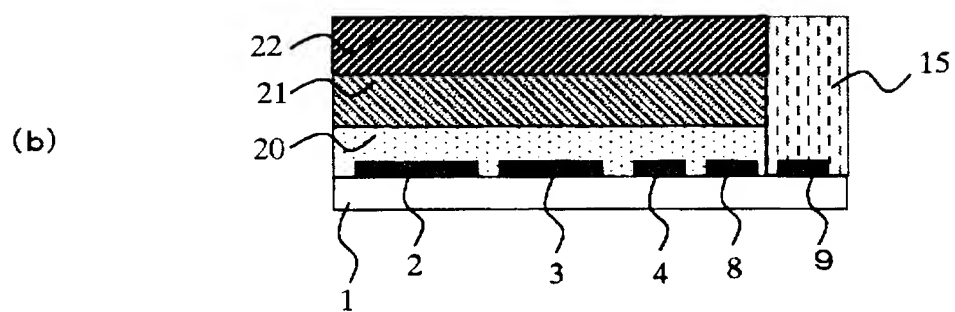
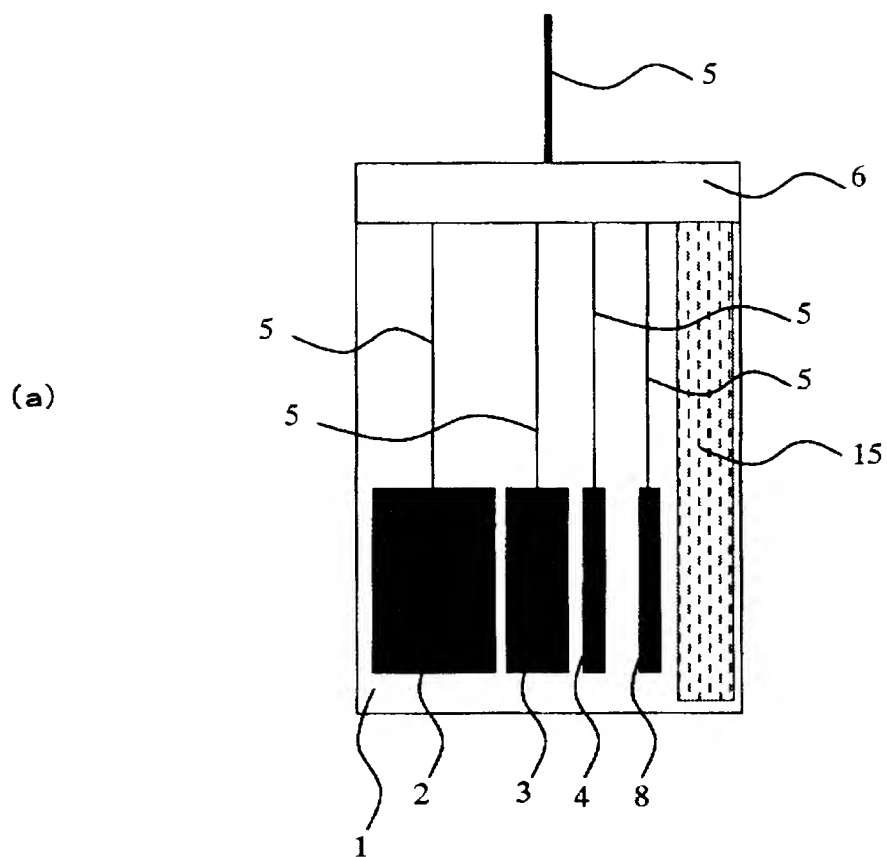
【図 7】



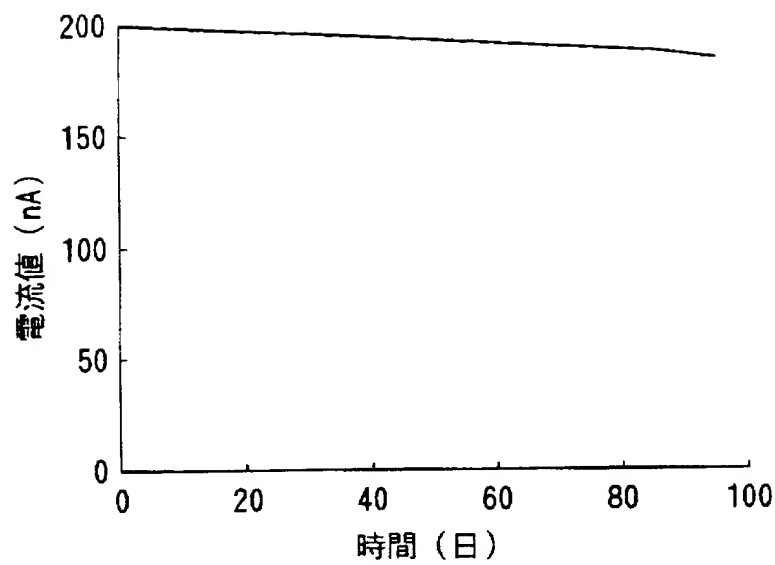
【図 8】



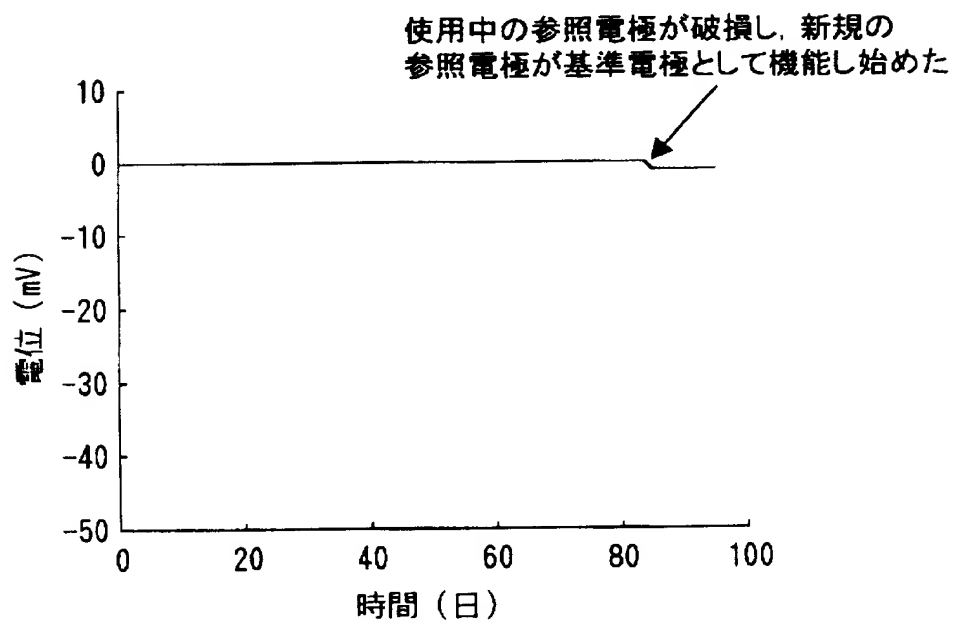
【図9】



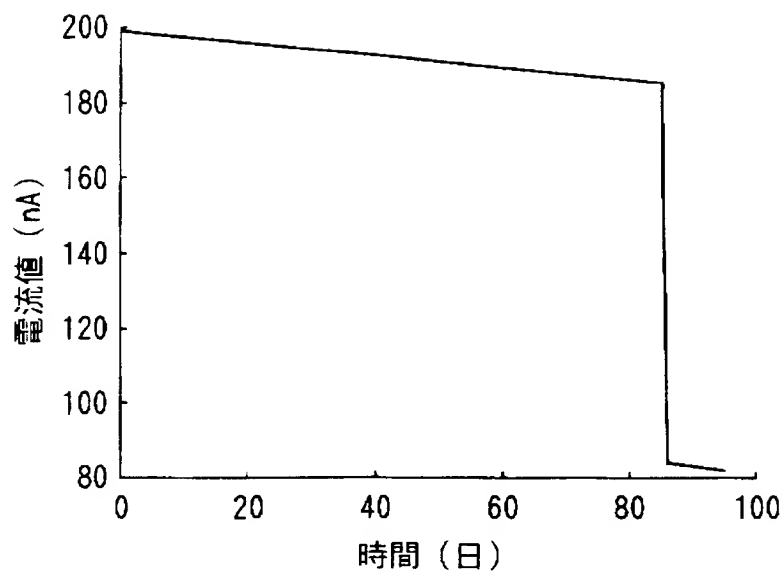
【図 1 0】



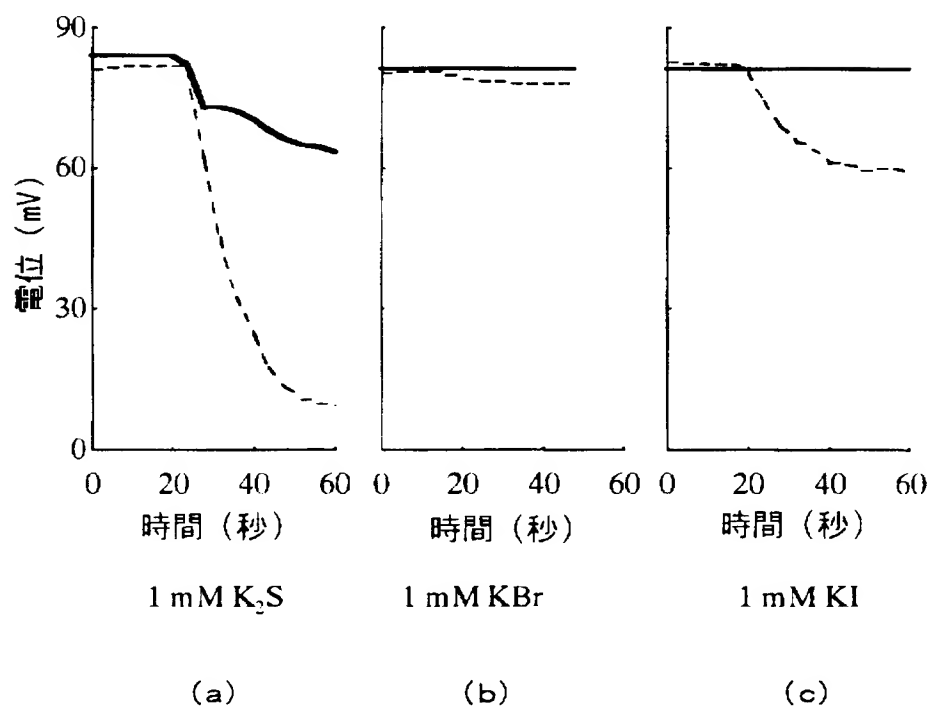
【図 1 1】



【図 1 2】

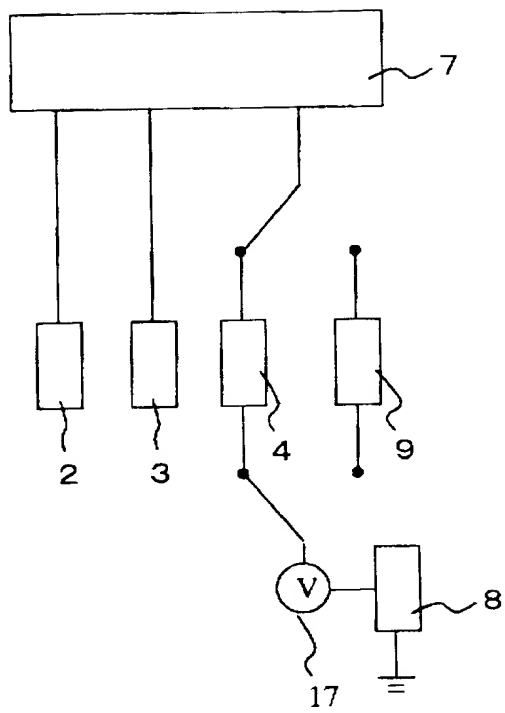


【図 1 3】

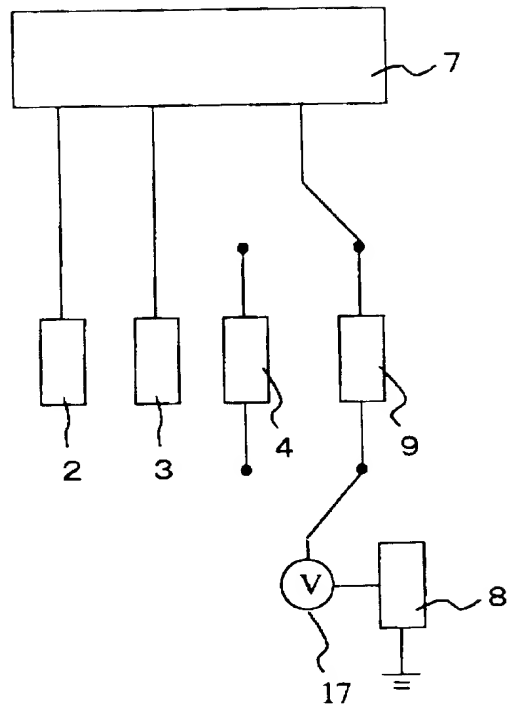


—— 制限透過層あり
 --- 制限透過層なし

【図 1 4】

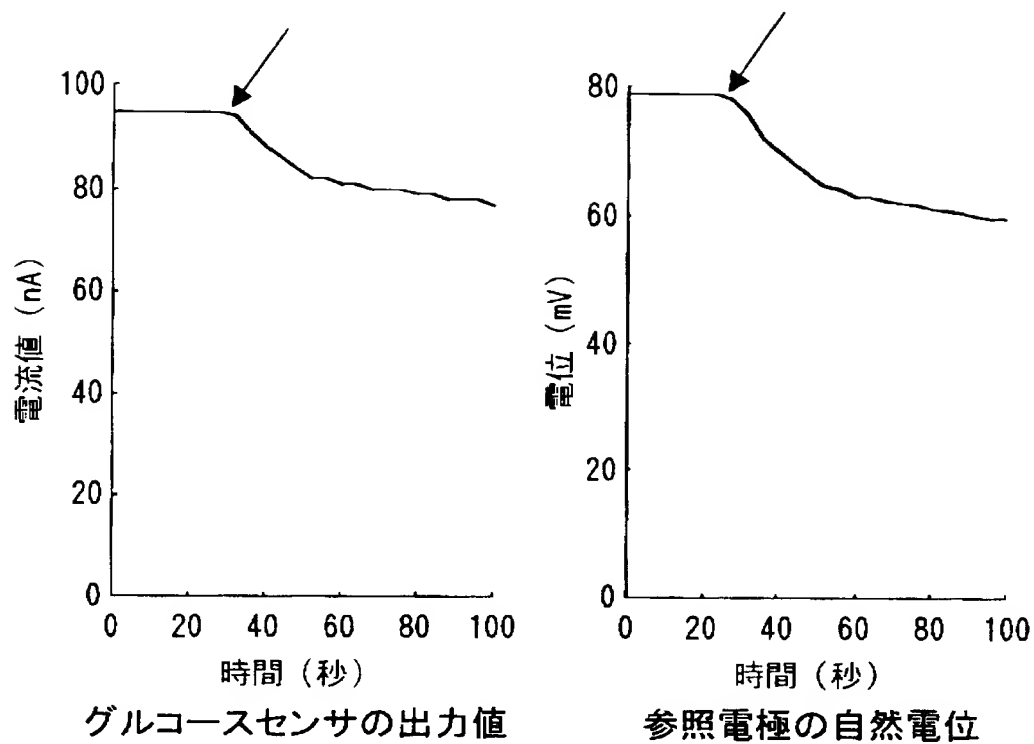


(a)



(b)

【図 1 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 参照電極を含む 3 極法による電気化学センサにおいて、参照電極に異常が発生したことを迅速に検出し、かかる異常を速やかに解消して測定値の信頼性を高めるとともに、長期にわたる連続測定を可能とし、さらにランニングコストの低減を図ることを目的とする。

【解決手段】 絶縁基板 1 上に作用極 2、対極 3 および参照電極 4 を形成し、参照電極 4 の電位を検査するための検査電極 8 を設ける。これらの電極の上に、結合層 20、固定化酵素層 21、および、フッ素樹脂からなる制限透過層 22 を設ける。検査電極 8 と参照電極 4 の間には電圧計を設け、検査電極 8 により参照電極 4 の電位を検査できるようにする。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 2 3 7]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号

氏 名 日本電気株式会社